

Beaudelaire Pierre-Charles

**O impacto da urbanização na atividade antioxidante de espécimes de *Sargassum stenophyllum* J. Agardh presentes na ilha de Santa Catarina**

**Projeto apresentado ao curso de graduação em Ciências Biológicas, Centro de Ciências Biológicas, da Universidade Federal de Santa Catarina como requisito para aprovação na disciplina BIO 7016 – Trabalho de Conclusão de Curso II.**

**Orientadora: Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Roselane Laudares Silva**

**Coorientadora : Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Cintia Lhullier**

Florianópolis  
2012

Beaudelaire Pierre-Charles

**O impacto da urbanização na atividade antioxidante de espécimes de *Sargassum stenophyllum* J. Agardh presentes na ilha de Santa Catarina.**

Este trabalho de conclusão de curso foi julgado adequado para obtenção do Título de “Bacharel” em Ciências Biológicas aprovado em sua forma final pelo Programa de bacharelado em Ciências Biológicas.

Florianópolis, 14 de dezembro de 2012.

---

Prof<sup>a</sup>. Maria Risoleta Freire Marques, Dr<sup>a</sup>.  
Coordenadora do Curso de Ciências Biológicas

**Banca Examinadora:**

---

Prof<sup>a</sup>. Roselane Laudaes Silva, Dr<sup>a</sup>.  
Orientador

---

Prof.<sup>a</sup> Fernanda Ramlov, Dr.<sup>a</sup>

---

Prof<sup>a</sup>. Cinthia Dalcuche Leal Martins, Dr<sup>a</sup>.

Este trabalho é dedicado aos meus queridos pais: Francina Pierre-Charles e Vilerin Pierre-Charles e minha cara orientadora, Professora Roselane Laudares Silva

## AGRADECIMENTO

Agradeço à Deus pela oportunidade e sua assistência em todas minhas atividades.

Agradeço de coração minha orientadora, professora Roselane Laudares Silva por transmitir seus conhecimentos pela paciência, dedicação e carinho.

A minha co-orientadora, Professora Cintia Lhullier pela disponibilidade, dedicação e carinho. Obrigado vocês por acreditarem em mim.

À minha mãe, uma mulher muito dedicada e corajosa; ao meu pai pelos incentivos.

Aos meus irmão e irmãs: Woolky Pierre-Charles, Dachna Pierre-Charles e Léa Pierre-Charles.

Aos meus primo e prima: Guerlie Joseph e Hebert Eniste. Eles cuidam sempre de mim seja de longe ou de perto.

Aos Professore Daniel José Da Silva pelos incentivos e apoio moral.

Aos meus amigos: Ecner Joseph, Abraham Jean e Jean Widler Othellot.

Ao meu amigo e colega de trabalho Angelet Sylvéus por me encorajar sempre.

Às amigas: Juliara Hoffman, e Stacy François.

À CAPES, pelo auxílio financeiro.

## RESUMO

As macroalgas como um dos principais constituintes dos ecossistemas costeiros, cuja diversidade é vital para a manutenção da biodiversidade marinha, são capazes de sobreviver sob amplas flutuações de diferentes fatores de natureza biótica e abiótica. A espécie *Sargassum stenophyllum* J. Agardh pertencente a classe Phaeophyceae, é uma das constituinte das comunidades fitobênticas. As substâncias antioxidantes presentes nos indivíduos desta espécie incluem pigmentos como clorofila, carotenos, flavonóides, e produtos de metabolismo secundário; divididos em: compostos fenólicos, alcalóides e terpenóides, possuem alta diversidade química e podem atuar como sinalizadores na interação das macroalgas com o meio. O trabalho teve como objetivo avaliar a atividade antioxidante e seus compostos relacionados para o espécime *Sargassum stenophyllum* J. Agardh frente a três praias do município de Florianópolis que apresentaram diferentes graus de urbanização de acordo com a sua balneabilidade, sendo que a balneabilidade foi avaliada em função da concentração de E. Coli/ml. Para os pigmentos analisados, a clorofila *a* apresentou pouca variação em suas concentrações de 1mg/ml, tanto em PC quanto em CV. Os resultados para as análises das concentrações encontradas para clorofila *c*, flavonóides, carotenóides na praia da Lagoinha foram excluídos por apresentaram valores incongruentes, os compostos fenólicos não variam muito entre PC e CV. A praia CV com melhores condições de balneabilidade apresentou maiores percentuais de inibição do DPPH em seguida pela praia PC. Porém, a LAG apresentou valores incongruentes, inferiores a 0,001 que é valor limite detectável pelo espectrofotômetro. Em relação à atividade antioxidante e compostos fenólicos podemos fazer uma relação direta, provavelmente por estes metabólitos serem os responsáveis pela atividade antioxidante no *Sargassum stenophyllum*. Também se observa uma relação inversamente proporcional quando comparados os valores de atividade antioxidante e compostos fenólicos com a balneabilidade, sugerindo que o impacto da urbanização afeta a produção de compostos antioxidantes, diminuindo o potencial de sequestro de radicais livres e consequentemente diminuindo a defesa destas macroalgas.

## ABSTRACT

Macroalgae as one of the major constituent of coastal ecosystems, whose diversity is vital for the maintenance of marine biodiversity, are able to survive under wide fluctuations of different biotic and abiotic factors. The species *Sargassum stenophyllum* J. Agardh belongs to the Phaeophyceae classe, and is part of the phytobenthic community. Antioxidants present in this species organisms include pigments such as chlorophyll, carotenoids, flavonoids, and products of secondary metabolism, divided into phenolic compounds, alkaloids and terpenoids, that possess high chemical diversity and can act as macroalgae signalisations in the interaction with the environment. This study aimed to evaluate the antioxidant activity and its related compounds for *Sargassum stenophyllum* J. Agardh in three Florianópolis beaches that showed different degrees of urbanization according to their bathing. The bathing was measured as a function of concentration of *E. Coli*/ml. For the pigments analyzed, chlorophyll a showed little variation in their concentrations of 1mg/ml, both on PC and CV. The results concentrations found for chlorophyll c, flavonoids, carotenoid analyzes on the beach of the LAG were excluded for showed incongruent values; phenolic compounds do not vary much between PC and CV. The beach (CV) with better bathing had higher percentages of DPPH inhibition. The beach PC and LAG beaches presented incongruent values, less than 0.001µg/ml, that is the limit value detectable by spectrophotometer. According to the antioxidant activity and phenolic compounds, we can make a direct relation, probably because these metabolites are responsible for the antioxidant activity in *Sargassum stenophyllum*. We also observed an inverse relationship when comparing the values of antioxidant activity and phenolic compounds with bathing, suggesting that the impact of urbanization affects the production of antioxidant compounds, reducing the potential for scavenging free radicals and consequently decreasing the defense of these macroalgae.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1:</b> Mapa do município de Florianópolis com a localização das Praias da Lagoinha, Ponta das Canas e Canasvieiras(Horn-Filho 2002).....	16
<b>Figura 2:</b> Método de coleta de <i>Sargassumstenophyllum</i> J. Agardh,.....	17
<b>Figura 3:</b> Coleta em maré baixa da espécie de <i>Sargassumstenophyllum</i> J. Agardh, .....	17
<b>Figura 4:</b> Percentagem de amostras com concentração superior a 2000 E. Coli/100 ml nas praias de Lagoinha (LAG), Ponta das Canas (PC) e Canasvieiras (CV) entre 2003 a 2012.....	22
<b>Figura 5:</b> Concentração ( $\mu\text{g.g}^{-1}$ ) das clorofilas <i>a</i> e <i>c</i> , carotenóides, flavonóides, composto fenólicos de <i>Sargassumstenophyllum</i> e percentagem de sequestro de radicais livres (DPPH) em três concentrações. 50, 100 e 200 $\mu\text{gml}^{-1}$ .....	23
<b>Figura 6:</b> Concentração de clorofila <i>a</i> em $\mu\text{g.g}^{-1}$ de <i>Sargassumstenophyllum</i> , nas praias de Lagoinha (LAG), Ponta das Canas (PC) e Canasvieiras (CAV).....	24
<b>Figura 7:</b> Concentração de clorofila <i>c</i> em $\mu\text{g.g}^{-1}$ de <i>Sargassumstenophyllum</i> , nas praias de Lagoinha (LAG), Ponta das Canas (PC) e Canasvieiras (CAV).....	25
<b>Figura 8:</b> Concentração de carotenóide em $\mu\text{g.g}^{-1}$ de <i>Sargassumstenophyllum</i> , nas praias de Lagoinha (LAG), Ponta das Canas (PC) e Canasvieiras (CAV).....	26
<b>Figura 9:</b> Concentração de flavonóide em $\mu\text{g.g}^{-1}$ de <i>Sargassumstenophyllum</i> , nas praias de Lagoinha (LAG), Ponta das Canas (PC) e Canasvieiras (CAV).....	27

**Figura 10:** Concentração de composto fenólico em  $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$  de *Sargassumstenophyllum*, nas praias de Lagoinha (LAG), Ponta das Canas (PC) e Canasvieiras (CAV)..... 27

**Figura 11:** Percentagem de seqüestro de radicais livres de *Sargassumstenophyllum*, nas praias de Lagoinha (LAG), Ponta das Canas (PC) e Canasvieiras (CAV)..... 28



## LISTA DE TABELAS

**Tabela 1:** Convenções para as praias e estações de coletas para análise de balneabilidade de acordo com FATMA..... 18

**Tabela 2:** Concentração ( $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ ) das clorofilas *a* e *c*, carotenóides, flavonóides, compostos fenólicos de *Sargassumstenophyllum* e percentagem de seqüestro de radicais livres (DPPH) em três concentrações: 50, 100 e 200  $\mu\text{gml}^{-1}$ ..... 35

## LISTA DE ABREVIATURAS

**E** - Índicio das estações da tabela 1.

**E.Coli** – Escherichia Coli.

**PC** - Praia de Ponta Das Canas

**CV**-Praia de Canasvieiras

**LAG** – Praia de Lagoinha

**FATMA** – Fundação de Meio Ambiente de Santa Catarina

**DPPH** –1,1-difenil-2-picrilhidrazil

## **SÚMARIO**

INTRODUÇÃO	12
<b>2. OBJETIVOS</b>	15
<b>2.1. Objetivo geral</b>	15
<b>2.2. Objetivos específicos</b>	15
<b>3. MATERIAIS E MÉTODOS</b>	16
3.1. Área de estudo	16
3.2. Material coletado	17
<b>3.3. Equipamentos, solventes e reagentes utilizados</b>	18
3.4. Preparo dos extratos	18
<b>3.5. Quantificação de carotenóides</b>	18
<b>3.6. Extração e quantificação de clorofila</b>	19
3.7. Extração e quantificação de flavonóides	19
3.8. Extração e quantificação de compostos fenólicos totais	19
<b>3.9. Avaliação da atividade antioxidante</b>	20
3.10. Cálculo de balneabilidade	21
3.11. Balneabilidade	22
<b>4. RESULTADOS E DISCUSSÕES</b>	23
<b>4.1. Compostos antioxidantes e Seqüestro de radicais livres</b>	23
<b>4.1.1. Clorofila <i>a</i></b>	24
<b>4.1.2. Clorofila <i>c</i></b>	24
<b>4.1.3. Carotenóides</b>	25
<b>4.1.4. Flavonóides e Compostos fenólicos</b>	26
<b>4.1.5. DPPH</b>	28
<b>5. CONCLUSÃO</b>	29
	10



## INTRODUÇÃO

Algas são organismos pertencentes a grupos polifiléticos que possuem clorofila *a* e um talo não diferenciado em raiz, caule ou folhas, com hábito predominantemente aquático. Neste ambiente, as algas podem fazer parte do bentos (indivíduos fixos ou associados ao substrato) ou plâncton (indivíduos suspensos na água). A faixa litorânea que as algas bênticas habitam pode estar dividida em: supralitoral, mesolitoral e infralitoral. O supralitoral corresponde à faixa mais alta do litoral, nunca ficando submerso. O mesolitoral pode estar temporariamente descoberto nas marés-baixas. Já o infralitoral corresponde à faixa que nunca fica exposta ao ar (Horta, 2000).

Harvey (1836) classificou as algas baseando-se na sua composição pigmentar e esta persiste até hoje. Dentre as principais linhagens eucarióticas podemos citar: Chlorophyta (algas verdes), Euglenofita, Rhodophyta (algas vermelhas) e Ochrophyta (algas pardas e diatomáceas), e Dinofita (dinoflagelados).

As macroalgas apresentam um dos principais constituintes dos ecossistemas costeiros, cuja diversidade é vital para a manutenção da biodiversidade marinha, assim como para o estabelecimento do equilíbrio e resiliência destes ambientes frente a perturbações naturais e antropogênicas (Miller et al., 2009). Esses organismos são capazes de sobreviver sob amplas flutuações de diferentes fatores de natureza biótica e abiótica como umidade, temperatura, salinidade e luz e sob a ação de ondas e da abrasão de partículas de areia em suspensão (Kraufvelin, 2007; Spathariset al.,2011). Esta capacidade de adaptação demanda adequações metabólicas e conseqüente síntese de metabólitos primários e secundários, que contribuem para o seu sucesso ao mediar interações ecológicas que trazem alguma vantagem seletiva aos organismos que os produzem (Arnold &Targett, 2003; Cronin, 2001; Teixeira, 2002).

A atividade e a concentração dos metabólitos secundários também podem ser influenciadas por fatores ambientais, tais como salinidade (Ragan&Glombitza, 1986), concentração de nutrientes (Yates&Peckol, 1993;

Cronin & Hay, 1996; Peckol et al., 1996), intensidade luminosa (Cronin & Hay, 1996c), radiação ultravioleta (Pavia et al., 1997) ou dessecação (Renaud et al., 1990). Desta forma, podemos inferir que a síntese e, conseqüentemente, a diversidade dos metabólitos produzidos por organismos de ambientes marinhos também podem estar sendo afetadas pelos impactos resultantes da urbanização destes ambientes (Vitousek et al., 1997).

As algas pardas apresentam cerca de 1800 espécies conhecidas atualmente (Algaebase). As algas pardas são quase exclusivamente marinhas (exceto por três gêneros de água doce) e predominam nos mares das regiões frias e polares. Neste grupo não existem representantes unicelulares. Seus tamanhos podem variar de poucos milímetros, podendo chegar a mais de 60 metros de comprimento (Raven et al., 2007). Algas pardas gigantes podem formar densas florestas marinhas, conhecidas como kelps. As paredes celulares das feófitas são constituídas de celulose e uma matriz mucilaginosa de ácido alginico (algina ou alginato), que fornece flexibilidade e resistência, ajudando a reduzir a dessecação durante a exposição nos períodos de maré baixa. Os principais pigmentos encontrados nas algas pardas são as clorofilas *a* e *c*, e vários tipos de carotenóides, incluindo a fucoxantina que proporciona a cor marrom escura ou verde oliva aos representantes deste grupo. O material de reserva das feófitas é a laminarina (um polímero de glicose) e o manitol, que ficam depositados nos vacúolos (Ingrid et al., 2010).

A espécie *Sargassum stenophyllum* J. Agardh pertencente à classe Phaeophyceae, presente na costa da ilha de Santa Catarina, constitui a faz parte da comunidade fitobêntica.

As substâncias antioxidantes, que esta espécie produz, incluem pigmentos como clorofila (WATANABE et al., 1993), carotenos (CHOI et al., 2008), flavonóides (Armsler e Fairhead 2006) e produtos de metabolismo secundário, divididos em compostos fenólicos, alcalóides e terpenóides. Elas podem atuar como sinalizadores na interação das macroalgas com o meio biótico e abiótico e possuem alta diversidade química (Verpoort 2000 et al. Harmann 2007).

A definição mais aceita para antioxidantes (AO) é que seriam substâncias as quais, mesmo presentes em baixas concentrações em relação ao substrato oxidante, poderiam atrasar ou inibir as taxas de oxidação (Sies, 1993). O fato de algumas algas secas poderem ser estocadas por um longo

período sem o perigo de deterioração oxidativa, mesmo apresentando mais de 30% do total de seus ácidos graxos na forma de cadeias poliinsaturadas(principalmente as algas pardas), despertou o interesse dos pesquisadores em relação ao mecanismo AO presente nessas algas (Fujimoto et Kaneda, 1980). As algas pardas que apresentaram maior atividade antioxidante foram: *Eiseniabyiclis*, *Sargassum kjellmanianum*, *Ishigeokamurae*, *Undaria pinnatifida*, *Heterochordaria abientinae*, *Scytosiphon lomentaria* (Fujimoto et Kaneda, 1984). A partir do fracionamento dos extratos clorofórmicos de *E. byclicis* e *U. pinnatifida*, os autores identificaram como princípios ativos responsáveis pela atividade antioxidante as frações fosfolipídicas (fosfatidiletanolamina e fosfatidilinosítido) e o composto fucoxantina, respectivamente. Em outro trabalho, os mesmos autores pesquisaram a atividade antioxidante de 36 espécies de algas bentônicas e, novamente, constataram que as algas pardas representavam o grupo com maior atividade (Fujimoto; Kaneda, 1984).

O Brasil possui pouca produção científica sobre investigação química de metabólitos ativos de organismos marinhos inclusive em relação à macroalgas bentônicas, os poucos estudos com a espécie *Sargassum stenophyllum* (DUARTE et al, 2001) demonstram resultados com outras classes de compostos e não testam a atividade antioxidante e seus compostos relacionados. (resultado)

Levando em consideração que o processo de urbanização costeira causa declínio na diversidade de comunidades ecológicas (Juanes et al., 2008; Orfanidis et al., 2003), é provável que essa diminuição possa ocorrer também em uma escala molecular, reduzindo a produção de compostos com atividade antioxidante e com isso sua atividade, que por sua vez tendem a produzir apenas o necessário para o funcionamento de suas funções básicas, dado o estresse a que estão submetidas. Nesse sentido, o conhecimento e o desenvolvimento de ferramentas para preservar a biodiversidade, assim como subsidiar sua utilização racional torna-se urgente, considerando-se a degradação crescente de diversos ecossistemas, entre eles o marinho, a deterioração da biodiversidade e a consequente perda do potencial uso biotecnológico (Worm et al., 2006).

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1. Objetivo geral**

Avaliar o impacto de diferentes graus da urbanização sobre a espécie *Sargassum stenophyllum* J. Agardh nas praias de Ponta das Canas, Lagoinha e Canasvieiras no norte da ilha de Santa Catarina em relação à atividade antioxidante dos extratos brutos produzidos pelas mesmas.

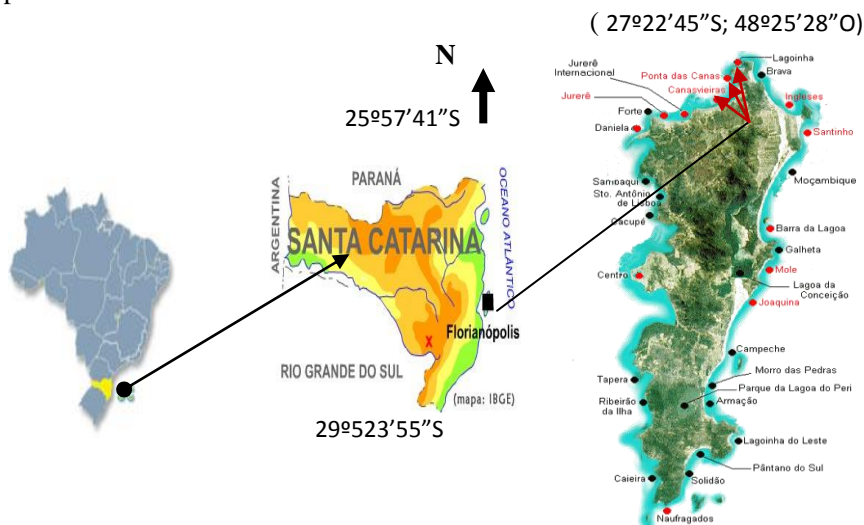
### **2.2. Objetivos específicos**

- 1- Avaliar a atividade antioxidante através do ensaio de DPPH dos extratos brutos das amostras de *Sargassum stenophyllum* nos diferentes pontos de coleta.
- 2- Avaliar a concentração *in vitro* de flavonóides das amostras de *Sargassum stenophyllum* nos diferentes pontos de coleta.
- 3- Avaliar a concentração *in vitro* de carotenóides das amostras de *Sargassum stenophyllum* nos diferentes pontos de coleta.
- 4- Avaliar a concentração *in vitro* de compostos fenólicos das amostras de *Sargassum stenophyllum* nos diferentes pontos de coleta.
- 5- Avaliar a concentração *in vitro* de clorofila *a* e *c1+c2* das amostras de *Sargassum stenophyllum* nos diferentes pontos de coleta.

### 3. MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1. Área de estudo

O material foi coletado no litoral norte da ilha de Santa Catarina na faixa do mesolitoral, nos costões rochosos das praias Canasvieiras, Ponta das Canas e Lagoinha no dia 28 de Setembro de 2012 com maré baixa entre 0.0 e 0.1. A praia de Canasvieiras ( $27^{\circ}25'29''\text{S}$ ;  $48^{\circ}28'40''\text{O}$ ), é uma das praias da Ilha de Santa Catarina que possui maior urbanização e população flutuante. Nesta praia, a descarga de efluentes domésticos ocorre na porção central da praia, o que pouco compromete os costões que a cercam, sendo, por este motivo, considerada menos impactada do que Lagoinha ( $27^{\circ}23'22''\text{S}$ ;  $48^{\circ}25'28''\text{O}$ ) e Ponta das Canas ( $27^{\circ}23'52''\text{S}$ ;  $48^{\circ}25'75''\text{O}$ ). Nestas praias a descarga dos efluentes ocorre próxima aos costões rochosos, sugerindo assim um possível impacto direto sobre as comunidades fitobênticas.



**Figura 1:** Mapa do município de Florianópolis com a localização das Praias da Lagoinha, Ponta das Canas e Canasvieiras (Horn-Filho 2002)



### 3.2. Material coletado

A área de coleta foi demarcada com um quadrado de 10x10 cm colocado sobre o costão rochoso. Todos os talos da área demarcada foram retirados com uma espátula. Foram feitas triplicatas para cada praia (Fig. 1 e Fig. 2). Logo após as coletas, as macroalgas foram armazenadas, colocadas em recipientes abrigados de luz e transportadas ao laboratório onde foram triadas e separadas do sedimento, epífitas e fauna associada.



**Figura 2:** Método de coleta de *Sargassum stenophyllum* J. Agardh.



**Figura 3:** Coleta em maré baixa da espécie de *Sargassum stenophyllum* J. Agardh.

### **3.3. Equipamentos, solventes e reagentes utilizados**

No ensaio de atividade antioxidante foi utilizado para a leitura de absorbância, o espectrofotômetro (Biospectro). Os solventes utilizados foram de graus analíticos de procedência Vetec. DDPH (1,1-difenil-2-picrilhidrazil) marca Sigma.

### **3.4. Preparo dos extratos**

As amostras foram secas durante dois dias dentro de uma capela à temperatura do ambiente, para evitar fotólise e termodegradação dos metabólitos. Após estarem secas, cada amostra foi macerada com nitrogênio líquido e pesada. Foi previamente estabelecida a proporção de 1 ml de solvente para cada 1 mg de peso seco de alga, obtendo assim uma concentração igual e conhecida para todos os extratos, eliminando efeito de concentração. A obtenção dos extratos foi feita em dois passos.

- a. Foi adicionada às amostras uma combinação de solventes orgânicos, iniciando com álcool metílico 100%. Foram conservadas na geladeira durante três dias e filtradas.
- b. Para terminar, foi adicionada a mesma proporção de hexano às amostras, filtradas depois de dois dias e acrescentadas nos extratos anteriores. Os extratos de diferentes graus de polaridade foram combinados, originando o extrato bruto.

### **3.5. Quantificação de carotenóides**

Em relação ao peso seco do extrato, este foi diluído com um volume proporcional de hexano depois feito o cálculo para obter uma concentração de 1mg/ml. Os valores de absorbâncias de carotenóides foram lidos em espectrofotômetro a 450nm. A quantificação de carotenóides foi feita usando se curva padrão  $\beta$ -caroteno de (0,5 a 10  $\mu\text{g.mL}^{-1}$   $-r^2 = 0,7945$ ;  $y = 0,1483x$ ). As análises foram realizadas em triplicata e os resultados foram expressos em  $\mu\text{g}$  de quercetina por g de massa seca.

### **3.6. Extração e quantificação de clorofila**

O mesmo processo foi utilizado para determinar clorofilas. Para os valores de absorbâncias da clorofila, três comprimentos de ondas foram lidos no espectrofotométrico a 632nm, 665nm e 750nm que é um valor aproximativo de demais compostos coloridos e para turbidez, onde clorofila e feofitina absorbam uma quantidade insignificante de luz.

### **3.7. Extração e quantificação de flavonóides**

A determinação do conteúdo de flavonoides totais foi feita de acordo com a Zacarias et al., 2007, com modificações. O ensaio do flavonóide foi realizado com uma concentração de 1mg/ml de solução do extrato diluído com metanol 100%. Uma alíquota de 0,5ml de cada extrato foi utilizada para a determinação do conteúdo de flavonóides totais, na presença de 0,5 mL de cloreto de alumínio (2% em metanol) e 2,5 mL de etanol.

Após repouso de 1 hora, fez-se a leitura em 420nm em espectrofotômetro (\*). A quantificação dos flavonoides foi feita a partir da curva padrão de quercetina (5 a 100  $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  -  $r^2 = 0,9503$ ;  $y = 0,161x$ ). As análises foram realizadas em triplicata e os resultados foram expressos em  $\mu\text{g}$  de quercetina por g de massa seca.

### **3.8. Extração e quantificação de compostos fenólicos totais**

A determinação do conteúdo de compostos fenólicos totais foi feita de acordo com a metodologia descrita por Rhandiret al. (2002). Em um tubo de ensaio, foi adicionado 1mL do extrato metanólico (metanol 80%, devido a sua maior eficiência de extração) de cada amostra e 5 mL de metanol 95%, seguido de agitação no vortex. Dessa solução, foi retirado 1 ml e a este adicionou-se 5

mL de água destilada, 1 mL de etanol 95% e 0,5 mL do reativo de Folin-Ciocalteu, seguido de 10 segundos de agitação e repouso de 5 minutos. Após, foi adicionado 1 mL de carbonato de sódio 5% (p/v), seguido de 10 segundos de agitação e repouso de 1 hora em câmara escura.

Em seguida, procedeu-se a leitura das amostras a 725nm em espectrofotômetro. A quantificação dos compostos fenólicos totais foi feita a partir da curva padrão de ácido gálico (50 a 800 µg.mL<sup>-1</sup> – r<sup>2</sup> = 0,99; y = 1,254x). As análises foram realizadas em triplicata e os resultados foram expressos em µg de ácido gálico por g de massa seca

### 3.9. Avaliação da atividade antioxidante

A fim de avaliar a capacidade antioxidante, os extratos brutos foram submetidos ao teste do DPPH, em triplicata, para cada uma das concentrações (50; 100 e 200) µg.mL<sup>-1</sup>. Este modelo é baseado na capacidade do radical livre estável 1,1-difenil-2-picrilhidrazil em reagir com substâncias doadoras de hidrogênio ( $\text{DPPH}^\bullet + \text{AH} \rightarrow \text{DPPH-H} + \text{A}^\bullet$ ), incluindo compostos fenólicos (Roginsky & Lissi 2005), sendo um método amplamente utilizado e relativamente rápido quando comparado a outras técnicas (Sanchez-Moreno et al. 1998, Mensor et al. 2001). O consumo de DPPH• é, portanto, um índice para estimar a capacidade antioxidante na captura de radicais livres presentes no meio. No ensaio espectrofotométrico, a absorbância a 517 nm diminui como resultado de uma alteração na coloração, de violeta para amarelo, uma vez que o radical é capturado por antioxidantes presentes no extrato através da doação de um átomo de H para formar a molécula estável DPPH-H (Espinet al. 2000).

A metodologia utilizada foi descrita por Kim et al. (2002). Uma alíquota de 2,9 mL da solução metanólica do radical DPPH (Sigma, 0,1 mM em metanol 80%) foi acrescida a 0,1 mL do extrato (em metanol 80%). O decréscimo da absorbância em 517 nm foi medido em espectrofotômetro após 30 minutos de incubação da amostra. A quercetina foi utilizada como padrão. Todas as amostras foram analisadas em triplicata.

A atividade de seqüestro do radical DPPH foi calculada pela equação abaixo:

$\% \text{ de inibição: } [(\text{Abs controle} - \text{Abs final da amostra}) / \text{Abs controle}] \times 100$
---

### 3.10. Cálculo de balneabilidade

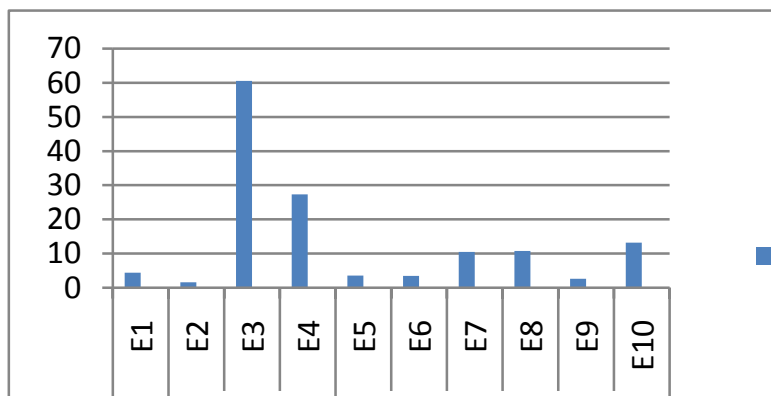
A avaliação do grau de impacto causada pela urbanização nas praias estudadas foi feita com base nos dados sobre balneabilidade, coletados mensalmente, entre 2003 e 2012, pela FATMA. As praias são consideradas próprias quando 80% ou mais do conjunto de amostras coletadas nas ultimas cinco semanas anteriores, no mesmo local apresentam até 800 *E.coli*/100ml e são consideradas impróprias quando mais de 20% de conjunto de amostras coletadas nas ultimas cinco semanas apresentam valor superior 800 *E. coli*/100ml ou na ultima coleta, superior a 2000 *E. Coli*/100ml. (Tab.1).

**Tabela 1:** Convenções para as praias e estações de coletas, para análise de balneabilidade, de acordo com FATMA.

Praia	Ponto de coleta	Estação
Lagoinha(LAG)	À esquerda saída lagoa	E1
Ponta das Canas(PC)	Em frente r. Heitor Bitencourt	E2
	Em frente n. 5.281 estrada geral	E3
	Em frente r. Alcina Jannis	E4
Canavieiras(CAV)	Em frente à r. das Flores	E5
	Em frente à Av. das Nações	E6
	Lado esquerdo do trapiche	E7
	Em frente r. Heitor Bitencourt	E8
	Canto esquerdo da praia - pedras	E9
	Frente r. Acari Margarita	E10

### 3.11. Balneabilidade

De acordo com os resultados obtidos para análises de balneabilidade efetuados, a praia de Ponta das Canas possui uma maior percentagem de coletas com valores superiores a 2000 *E.coli*em 100ml. As maiores concentrações foram encontradas na estação E3 e E4. As praias de Lagoinha e Canasvieiras apresentam menor número de coletas com valores superiores a 2000 *E. Coli* em 100 ml. *E. Coli* é uma bactéria intestinal que é eliminada nos efluentes domésticos. Quanto maior a concentração de *E. Coli* nas amostras, maior o volume de efluentes domésticos não tratados que chegam ao mar. Com base neste dados, podemos sugerir que a praia mais impactada é Ponta das Canas seguida por Canasvieiras e Lagoinha. (Fig. 4)



**Figura 4:** Percentagem de amostras com concentração superior a 2000 *E. Coli*/100 ml nas praias de Lagoinha (LAG), Ponta das Canas (PC) e Canasvieiras (CAV) entre 2003 a 2012.

## 4. RESULTADOS E DISCUSSÕES

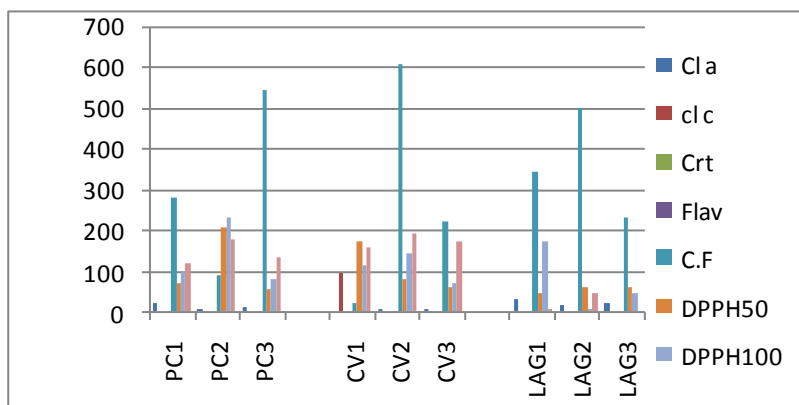
### 4.1. Compostos antioxidantes e Sequestro de radicais livres

Os resultados para as análises das concentrações encontradas para clorofila *c*, flavonóides, carotenóides na praia da Lagoinha foram excluídos por apresentarem valores incongruentes, o que poderia ser atribuído a alguma falha na metodologia de análise (Tab. 2).

A clorofila *a* apresentou pouca variação em suas concentrações tanto em PC quanto em CV (Fig. 5). Em PC as concentrações foram ligeiramente superiores à CV.

Para os compostos fenólicos foram eliminados as réplicas PC2 e CV1, por apresentarem valores discrepantes em relação às duas réplicas restantes. Estas concentrações não variam muito entre PC e CV (Fig. 5 e Tab. 2).

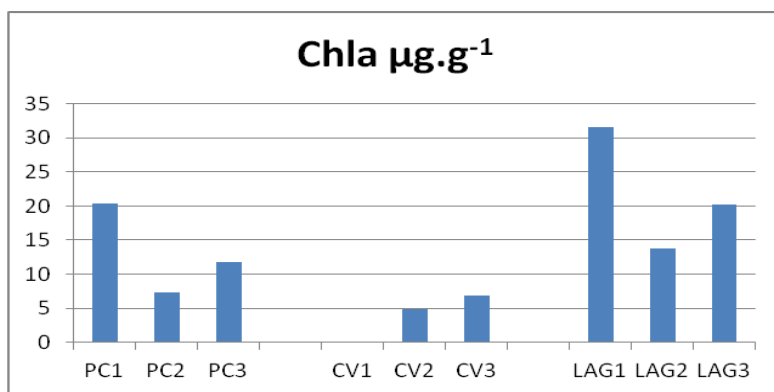
Para a análise de percentagem de inibição de sequestro de radicais livres, as replicas PC2 e CV1 foram eliminados por não apresentaram valores congruentes. Nas réplicas restantes analisados, ocorreu um aumento progressivo de % de inibição, em função da concentração de DPPH utilizados (Fig. 5 e Tab. 2 em anexo).



**Figura 5:** Concentração ( $\mu\text{g.g}^{-1}$ ) das clorofilas *a* e *c*, carotenóides, flavonóides, composto fenólicos de *Sargassum stenophyllum* e percentagem de sequestro de radicais livres (DPPH) em três concentrações. 50, 100 e 200  $\mu\text{gml}^{-1}$ , nas praias PC, CV e LAG.

#### 4.1.1. Clorofila *a*

Diferentes tipos de clorofila ocorrem nas algas, sendo universal a clorofila *a* (Hoeck, Van den e al, 1990). Clorofilas são facilmente alteradas mesmo sob ligeira condição de acidez ou luz forte, à temperatura ambiente. Embora o único fator considerado para avaliar o ambiente tenha sido balneabilidade as diferenças observadas na concentração da clorofila *a* na espécie *Sargassumstenophyllum* podem ter ocorrido em resposta aos fatores mencionados acima (Fig. 6).

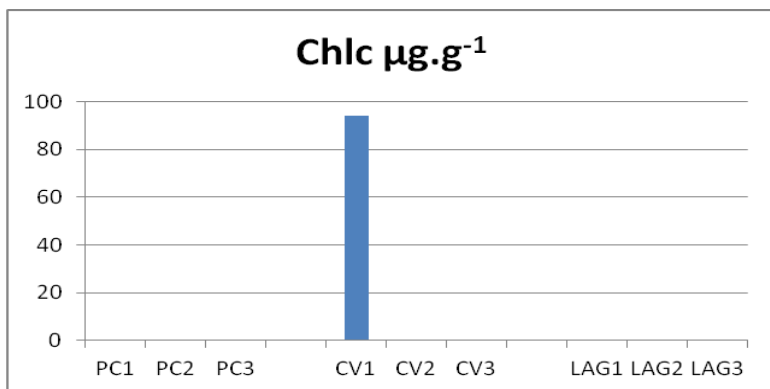


**Figura 6:** Concentração de clorofila *a* em µg.g<sup>-1</sup> de *Sargassumstenophyllum*, nas praias de Ponta das Canas (PC), Canasvieiras (CV) e Lagoinha (LAG).

#### 4.1.2. Clorofila *c*

Nas amostras analisadas, nenhuma concentração de clorofila *c* foi detectada para as réplicas de PC. Somente CV1 apresentou um valor de concentração. Por isto este valor observado em CV1 pode ser decorrente de falhas de metodologia no caso individual do espécime processado (Fig. 7).

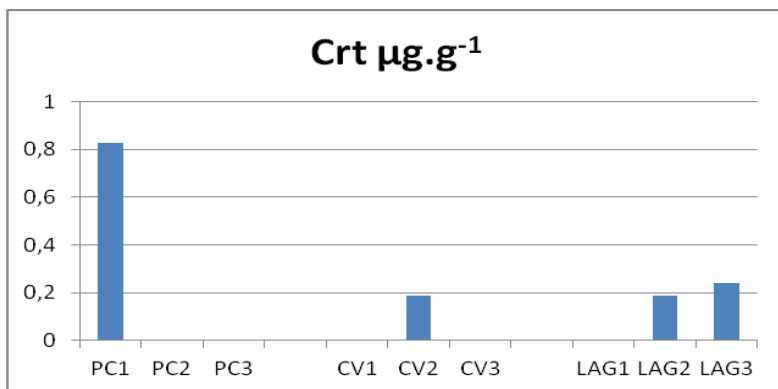




**Figura 7:** Concentração de clorofila c em  $\mu\text{g.g}^{-1}$  de *Sargassum stenophyllum*, nas praias de Lagoinha (PC), Ponta das Canas (CV) e Canasvieiras (LAG).

#### 4.1.3. Carotenóides

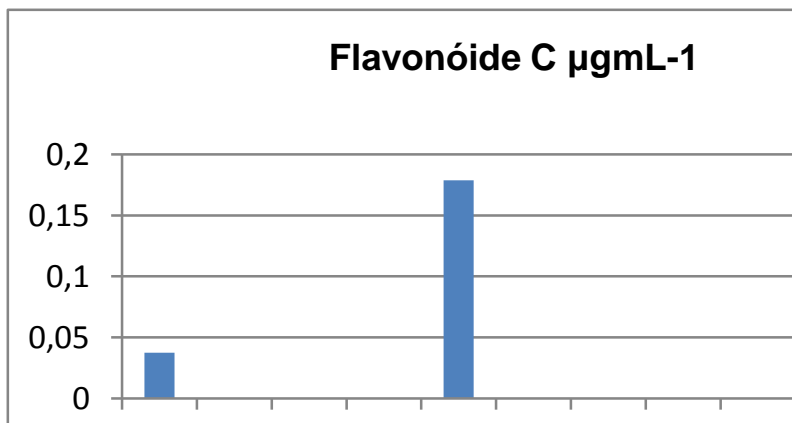
As diferenças observadas no perfil carotenóidico da espécie *Sargassum stenophyllum*, estão relacionadas à fotoaclimação e fotoproteção da espécie a um determinado ambiente. Esta hipótese é coerente, uma vez que a condição de aclimação nas praias é distinta, o que pode ocasionar respostas diferentes em uma mesma espécie. Um aumento no conteúdo de carotenóide pode estar relacionado à concentração de oxigênio dissolvido na água do mar porque a presença de radicais livres de oxigênio estimula a síntese de carotenóides. A formação de radicais livres ocorre como resposta ao estresse causado pelo excesso de luz e mecanismos de fotoproteção devem atuar a fim de inibir o processo de fotoinibição e conseqüentemente, a fotoxidação dos pigmentos. Um dos mecanismos utilizados na proteção das células é a síntese de carotenoides (RAMLOV 2006). Nas amostras analisadas, os carotenóides apresentaram concentrações baixas ou não detectadas e por isto o valor mais alto observado em CV1 pode ser decorrente de falhas de metodologia um caso individual da espécimes processada (Fig. 8).



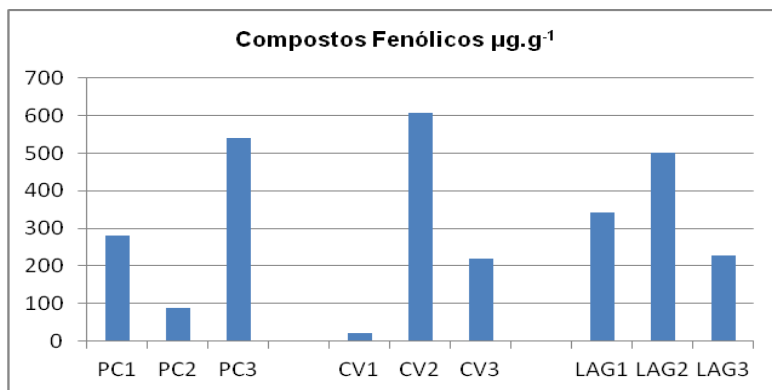
**Figura 8:** Concentração de carotenóide em  $\mu\text{g.g}^{-1}$  de *Sargassumstenophyllum*, nas praias de Lagoinha (PC), Ponta das Canas (CV) e Canasvieiras (LAG).

#### 4.1.4. Flavonóides e Compostos fenólicos

Os flavonóides constituem uma subclasse dos compostos fenólicos. Apenas em duas réplicas PC1 e CV1 foram detectados sendo que a concentração de CV1 foi maior que de PC1 (Fig. 9). No entanto as concentrações de compostos fenólicos que expressam o total não guardaram a mesma relação com os flavonóides, sendo que em CV1 ocorreram às menores concentrações (Fig. 10). Na espécie *Sargassumstenophyllum* a ocorrência de flavonóides é menor do que os carotenóides e compostos fenólicos.



**Figura 9:** Concentração de flavonóide em µg.g<sup>-1</sup> de *Sargassumstenophyllum*, nas praias de Lagoinha (PC), Ponta das Canas (PC) e Canasvieiras (CAV).

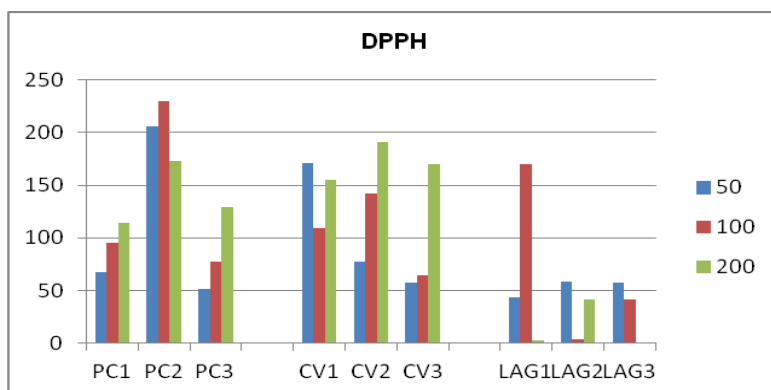


**Figura 10:** Concentração de composto fenólico em µg.g<sup>-1</sup> de *Sargassumstenophyllum*, nas praias de Lagoinha (PC), Ponta das Canas (CV) e Canasvieiras (LAG)

#### 4.1.5. DPPH

Comparando os extratos brutos dos espécimes de *Sargassumstenophyllum* coletados em PC e CV, constatou-se que os maiores percentuais de inibição foram obtidos para os **de CV** (Fig 11). A praia de Canasvieiras (CV) com melhores condições de balneabilidade, apresentou também melhores valores para atividades AO. Por conseguinte, os dados sugerem que o impacto da urbanização afete a produção de compostos antioxidantes, diminuindo o potencial de sequestro de radicais livres e consequentemente diminuindo a defesa destas macroalgas.

Com base nestes dados sugere-se que exista possivelmente uma relação das condições de balneabilidade das praias com a capacidade antioxidantedos extratos brutos das macroalgas coletadas (Fig. 11).



**Figura 11:** Percentagem de inibição do radical DPPH em extratos brutos de *Sargassumstenophyllum*, das praias de Lagoinha (LAG), Ponta das Canas (PC) e Canasvieiras (CV).

## 5. CONCLUSÕES

1. Com base nos dados de porcentagem de inibição do DDPH, sugere-se que deve haver uma relação direta das condições de balneabilidade das praias com a capacidade AO dos compostos isolados de *S.stenophyllum*:

2. Não foi demonstrada a relação das concentrações isoladas dos compostos antioxidantes(clorofilas, carotenóides e fenólicos) analisados em *S. stenophyllum*, com as condições de balneabilidade das praias estudadas.

## 6. BIBLIOGRAFIA

ARNOLD, T.M., TARGETT, N.M., 2003. To grow and defend: lack of tradeoffs for brown algal phlorotannins. *Oikos* 100, 406-408.

BARBOSA, J.P., FLEURY, B.G., GAMA, B.A.P. da, TEIXEIRA, V.L., PEREIRA, R.C., 2007. Natural products as antifoulants in the Brazilian brown alga *Dictyota paffii* (Phaeophyta, Dictyotales). *Biochemical Systematics and Ecology* 35, 549-553.

BLUNT, J.W., COPP, B.R., MUNRO, M.H.G., NORTHCOTE, P.T., PRINSEP M.R., 2010. Marine natural products. *Natural Products Reports* 27, 165-237.

CHEW, Y.L., LIM, Y.Y., OMAR, M., KHOO, K.S., 2008. Antioxidant activity of three edible seaweeds from two areas in South East Asia. *LWT* 41, 1067-1072.

CHOI, C.W. et al., 2002. Antioxidant activity and free radical scavenging capacity between Korean medicinal plants and flavonoids by assay-guided comparison. *Plant Science*, v. 163, p. 1161-1168.

CRONIN, G., HAY, M.E., 1996c. Effects of light and nutrient availability on the growth, secondary chemistry, and resistance to herbivory of two brown seaweeds. *Oikos* 77, 93-106.

DA-QING, J., CHOL SEUNG, L., JIN-YOUNG, S., HAN GIL, C., ILHO, H., JUNG-SOO, H., 2006. *Ulva conglobata*, a marine algae, has neuroprotective and anti-inflammatory effects in murine hippocampal and microglial cells. *Neuroscience Letters* 402, 154-158.

DUARTE, M.E.R. et al., 2001. Structural studies on fucoidans from the brown seaweed *Sargassum stenophyllum*. *Carbohydrate Research*, v. 333, p. 281-293.

FREILE-PELEGRIN, Y., ROBLEDOS, D., CHAN-BACAB, M.J., ORTEGA-MORALES, B.O., 2008. Antileishmanial properties of tropical marine algae extracts. *Fitoterapia* 79, 374-377.

FUJIMOTO K, KANEDA T 1980. Screening test for antioxygenic compounds from marine algae and fraction from *Eiseniabicyclis* and *Undariapinnatifida*. *Bull Japan SocSci Fisheries* 46: 1125-1130.

FUJIMOTO K, KANEDA T 1984. Separation of antioxygenic (antioxidant) compounds from marine algae. *Hydrobiologia* 116: 111-113.

GHOSH, P., ADHIKARI, U., GHOSAL, P.K., PUJOL, C.A., CARLUCCI, M.J., DAMONTE, E.B., RAY, B., 2004. In vitro anti-herpetic activity of sulfated polysaccharide fractions from *Caulerparacemosa*. *Phytochemistry* 65, 3151-3157.

HARVEY, W.H. 2007. Algae. In: *Flora Hybernica*, part 3, Dublin: Mackay, J.T. Editors., 1836. 157-254 p.

HIDARI, K.I.P.J., TAKAHASHI, N., ARIHARA, M., NAGAOKA, M., MORITA, K., SUZUKI, T., 2008. Structure and anti-dengue virus activity of sulfated polysaccharide from a marine alga. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 376, 91-95.

HOOPER, D.U., CHAPIN, F.S., EWEL, J.J., HECTOR, A., INCHAUSTI, P., LAVOREL, S., LAWTON, J.H., LODGE, D.M., LOREAU, M., NAEEM, S., SCHMID, B., SETÄLÄ, H., SYMSTAD, A.J., VANDERMEER, J., WARDLE, D.A., 2005. Effects of biodiversity on ecosystem functioning: a consensus of current knowledge. *Ecological Monographs* 75, 3-35

HORTA, P.A. 200. Aspectos taxonômicos e ecologia de macroalgas benthicas. UFSC.

JOOSTEN, A.M.T.; VAN DEN HOEK, C., 1986. World-wide relationships between red seaweed floras: a multivariate Approach. *Botanica Marina*, v. 29, p. 195-214.

- JUANES J.A., GUINDA, X., PUENTE, A., REVILLA, J.A., 2008. Macroalgae, a suitable indicator of the ecological status of coastal rocky communities in the NE Atlantic. *Ecological Indicators* 8, 351-359.
- KRAUFVELIN, P., 2007. Responses to nutrient enrichment, wave action and disturbance in rocky shores communities. *Aquatic Botany* 87, 262-274.
- LEE, R.E. *Phycology*. 2nd ed. Cambridge, University Press, 1989. 645 p.
- MILLER, R.J., REED, D.C., BRZEZINSKI, M.A., 2009. Community structure and productivity of subtidal turf and foliose algal assemblages. *Marine Ecology Progress Series* 388, 1-11.
- MUMBY, P.J., 2001. Beta and habitat diversity in marine systems: a new approach to measurement, scaling and interpretation. *Oecologia* 128, 274-280.
- ORFANIDIS, S., PANAYOTIDIS, P., STAMATIS, N., 2003. An insight to the ecological evaluation index (EEI). *Ecological Indicators* 3, 27-33.
- PAVIA, H., CERVIN, G., LINDGREN, A., ABERG, P., 1997. Effects of UV-B radiation and simulated herbivory on phlorotannins in the brown algae *Ascophyllum nodosum*. *Marine Ecology Progress Series* 157, 139-146.
- PECKOL, P., KRANE, J.M., YATES, J.L., 1996. Interactive effects of inducible defense and resource availability on phlorotannins in the North Atlantic brown algae *Fucus vesiculosus*. *Marine Ecology Progress Series* 138, 209-217.
- PINTO, C.A. et al. *Produtos Naturais: Atualidade, desafios e perspectivas*. *Química Nova*, v. 25, p. 45-61, 2002.
- RAGAN, M.A., GLOMBITZA, K.W., 1986. Phlorotannins, brown algal polyphenols. *Progress in Phycological Research* 4, 129-241.



RAMLOV R173v 2010., Variação sazonal dos carotenóides e composto fenólico e estudos fisiológicos em diferentes estádios reprodutivos em *Gracilaria domingensis* (Kütz). Tese (Doutorado) P. 7.

RAVEN, P. H.; EVERT, R. F. & EICHHORN, S. E. 2007. *Biologia Vegetal*. 7ª. ed. Ed. Editora Guanabara Koogan, Rio de Janeiro. 830 pp.

RENAUD, P.E., HAY, M.E., SCHMITT, T.M., 1990. Interactions of plant stress and herbivory: Intra-specific variation in the susceptibility of a palatable versus unpalatable seaweed to sea urchin grazing. *Oecologia* 82, 217-226.

SIES H 1993. Strategies of antioxidant defense. *Eur J Biochem* 215: 213-219.

SIMÓ, D.H., HORN FILHO, N.O., 2004. Caracterização e distribuição espacial das “ressacas” e áreas de risco na Ilha de Santa Catarina. *Gravel* 2, 93-103.

SPATHARIS, S., ORFANIDIS, S., PANAYOTIDIS, P., TSIRTSIS, G., 2011. Assembly processes in upper subtidal macroalgae: The effect of wave exposure. *Estuarine, Coastal and Shelf Science* 91, 298-305.

TSUDA, M., KARIYA, Y., IWAMOTO, R., FUKUSHI, E., KAWABATA J., KOBAYASHI, J., 2005. Amphidinolides B4 and B5, potent cytotoxic 26-membered macrolides from dinoflagellate *Amphidinium* species. *Marine Drugs* 3, 1-8.

VAN DEN HOEK, C. World-wide latitudinal and longitudinal seaweed distribution patterns and their possible causes, as illustrated by the distribution of Rhodophytan genera. *Helgoländer Meeresuntersuchungen*, v. 38, p. 227-257, 1984.

VERPOORTE, R. 2000. Secondary metabolism. In: R. Verpoorte & A.W. Alfermann (eds.). *Metabolic engineering of plant secondary metabolism*, 1ed. Kluwer Academic Publishers, Netherlands, p. 1-29.

VITOUSEK, P.M., MOONEY, H.A., LUBCHENCO, J., MELILLO, J.M., 1997. Human domination of earth's ecosystems. *Science* 277, 494-499.

WATANABE, N. et al. New Chlorophyll-A-Related Compounds Isolated as antioxidants from Marine Bivalves. *Journal of Natural Products*, v. 56, p. 305- 317, 1993.

WORM, B., BARBIER, E.B., BEAUMONT, N., DUFFY, J.E., FOLKE, C., HALPERN, B.S., JACKSON, J.B.C., LOTZE, H.K., MICHELI, F., PALUMBI, S.R., SALA, E., SELKOE, K.A., STACHOWICZ, J.J., WATSON, R., 2006.Impacts of Biodiversity Loss on Ocean Ecosystem Services. *Science* 314, 787-790.

YATES, J.L., PECKOL, P., 1993. Effects of nutrient availability and herbivory on polyphenolics in the seaweed *Fucusvesiculosos*.*Ecology* 74, 1757-1766.

ZACARIAS, A.A., MORESCO, H.H., HORST, H., BRIGHENTE, I.M.C., MARQUES, M.C.A. & PIZZOLLATI, M.G.2007.Determinacao do teor de fenolicos e flavonoides no extrato e fracos de *Tabebuia heptaphylla*. In: 30a Reuniao Anual da Sociedade Brasileira de Quimica, Santa Maria, Rio Grande do Sul. Setembro/1999.

**Tabela 2:** Concentração ( $\mu\text{g.g}^{-1}$ ) das clorofilas a e c, carotenóides, flavonóides, composto fenólicos de *Sargassum stenophyllum* e percentagem de seqüestro de radicais livres (DPPH) em três concentrações. 50, 100 e 200  $\mu\text{gml}^{-1}$  (Valores

Anostras	Chlo a	Chlo c	Crt	Flav	C. Fenól	DPPH50	DPPH100	DPPH200
<b>PC1</b>	20,30888	0	0,828606	0,837811	279,7213	67,16698	95,12195	113,88
<b>PC2</b>	7,310554	0	0	0	88,29268	206,1914	229,8311	173,17
<b>PC3</b>	11,73869	0	0	0	541,4634	51,96998	77,11069	129,64
<b>CV1</b>	0	94,13422	0	2,753058	21,46341	170,9193	109,5685	154,78
<b>CV2</b>	4,906706	0	0,186085	0	608,3624	77,67355	142,0263	191,1
<b>CV3</b>	6,786754	0	0	0	220,3484	57,03565	64,72795	170,35
<b>LAG1</b>	31,57129	0	0	0	340,9756	43,90244	169,7936	3,1894
<b>LAG2</b>	13,79956	0	0,18597	0	500	58,34897	3,377111	41,838
<b>LAG3</b>	20,16967	0	0,238905	0	227,7352	57,41088	41,83865	

**zero:** inferiores aos limites de detecção do espectrofotômetro de 0,001  $\mu\text{g/mL}$  são substituído por zero)